

INSTITUTO NACIONAL AUTONOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

| | |
|---|---|
| Fecha de presentación | Marzo del 2009 |
| Estación Experimental | Santa Catalina |
| Programa / Departamento | Departamento de Nutrición y Calidad |
| Proyecto Fortalecimiento 21 00068 001/ 028 | Agroindustria, Energía, Nutrición |
| Componente 1 | Valoración de cultivos y materias primas para respaldar las certificaciones de origen, desarrollar y aplicar procesos tecnológicos agroindustriales a través de sistemas integrados de calidad, sanidad e inocuidad a lo largo de la cadena agroproductiva. |
| Título actividad | Evaluación de la capacidad ocratoxigénica de hongos productores de Ocratoxina A en el café verde ecuatoriano. |
| Ubicación | Estación Experimental Santa Catalina Cutuglahua – Pichincha. |
| Autor | Egdo. Alex Danilo Portilla Ortega |
| Co-Autores | Dra. Susana Espín Dra. María Luisa Insuasti Dr. Iván Samaniego |
| Colaboradores | Consejo Cafetalero Nacional COFENAC Departamento de Protección Vegetal EESC |
| Fecha Inicio | Enero 2009 |
| Fecha de terminación | Diciembre 2009 |
| Presupuesto | USD 9837,38 |
| Fuente de financiamiento | INIAP 59% Aporte Tesista 41% |

1. ANTECEDENTES

El café, es uno de los cultivos que se ha destacado en las exportaciones agrícolas del país, el mismo que conjuntamente con el cacao y el banano constituyen una fuente de empleo y de divisas para la economía ecuatoriana. Existen alrededor de 100.000 Unidades de Producción Agropecuaria (UPAS) de café, de lo que se desprende que 100.000 familias se encuentran vinculadas a esta actividad, es decir alrededor de 500.000 personas. (MAGAP 2007).

El Ecuador es parte de los 14 países productores de café que tienen producción mixta, es decir se cultivan las dos principales especies de café: *Coffea arabica* (café arábigo), que se puede cultivar en altitudes de 600 a 2000m, a una temperatura media de entre 18 y 22,5 °C, y *Coffea canephora* (café robusta), que se puede cultivar a una altitud inferior a los 600m y a una temperatura promedio de entre 22 y 26 °C. Las dos especies se cultivan en zonas tropicales húmedas. (FAO/OMS 2007, FAO 2007).

Según los datos del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca (MAGAP 2007), existen 220.000 ha de cultivo de café de las cuales 148.357 ha. (68% de la superficie total) corresponden al café arábigo y 71.255 ha a café robusta. Actualmente, este cultivo se encuentra ubicado a nivel nacional, pero la zona de mayor producción es Jipijapa en la provincia de Manabí. La producción de café arábigo, considerado de mejor calidad se concentra específicamente en Manabí, Loja, Guayas y las estribaciones de la cordillera occidental de los Andes, en tanto que el café robusta se cultiva en la Amazonía, es decir en Sucumbíos y Orellana, en su mayor porcentaje.

Las exportaciones de café en grano, en el año 2005 se ubicaron en 301.717 sacos de 60Kg., en tanto que en el 2006, se exportó 293.300 sacos, y en el 2007 se ha exportado alrededor de 181.483 sacos de 60Kg. El ingreso de divisas por este rubro, ha disminuido considerablemente en los últimos dos años, de 32 millones de dólares en el 2006 hasta 22 millones en el 2007, aunque el precio pagado al productor a partir del 2005 se ha incrementado de 52 a 66 dólares. (MAGAP 2007).

A partir de la crisis en el precio internacional del café que inicio a finales de 1998, los productores de café han enfrentado serios problemas para mantener la producción y los precios, sumada a las nuevas regulaciones técnicas que limitan los niveles de contaminación con la micotoxina Ocratoxina A (OTA). Estos límites reglamentarios se aplican principalmente en países de la Unión Europea, importante mercado para el café ecuatoriano, razón por la cual en el año 2001, la Asociación de Exportadores de Café (ANECAFE) se vio en la necesidad de iniciar acciones para evitar la contaminación del café con micotoxinas, participando en el Proyecto global “Mejoramiento de la Calidad del café, mediante la prevención de la formación de hongos productores de OTA” financiado por el Fondo Común de Productos Básicos y la FAO, habiendo identificado que las condiciones en que se produce el café en el país son propicias para la contaminación y deterioro del producto por presencia de OTA (FAO 2007).

La OTA es una micotoxina que puede encontrarse como contaminante natural en los cereales, especialmente en la cebada y arroz, subproductos de cereales, harinas, y en una serie de alimentos como **granos de café**, legumbres, frutas, quesos, carnes ahumadas como jamón, tocino y embutidos, cerveza, especias, vino y frutos de la vid. Es un metabolito fúngico secundario que presenta efectos nefrotóxicos, teratógenos e inmunosupresores, además el Centro Internacional de Investigaciones sobre el cáncer (IACR) la ha clasificado en el Grupo 2B: **agente posiblemente carcinógeno**; la evidencia en humanos es limitada y tampoco hay suficiente evidencia con animales de experimentación (Soriano 2007).

Frente a este panorama el *Codex alimentarius* establece criterios para evitar que se comercialicen productos que puedan ocasionar daños a la salud. Dentro de estas medidas

existen límites máximos de contaminación para algunos productos. La concentración de OTA está considerada dentro de estos lineamientos. Según la Unión Europea el contenido máximo de OTA en el café tostado y molido es de 5ppb y en el café soluble es de 10 ppb, mientras que para el café verde, aunque no se define todavía el contenido máximo esta alrededor de **15ppb**. (FAO/MAG/ANECAFE 2006).

Existen múltiples factores que intervienen en el desarrollo fúngico y en la producción de metabolitos secundarios. Algunos de estos factores son intrínsecos y constituyen la expresión de las propiedades físicas, químicas y biológicas del alimento tales como: actividad de agua (a_w), pH y nutrientes. Por otro lado existen factores extrínsecos que afectan al comportamiento de la cepa y hacen que la invasión fúngica, la infección y la elaboración de micotoxinas en diferentes sustratos naturales dependan en gran medida de ellos; entre estos factores podemos citar las condiciones ambientales tales como : temperatura y humedad relativa. (Bravo 2006, Franco 2005).

En el café, tres especies de hongos, todas pertenecientes al género *Aspergillus*, han sido identificados como productores de OTA, el agregado *A. niger* es el más frecuente, en particular en el *Coffea canephora* (robusta), pero la producción de OTA es escasa. La variedad *A. carbonarius* suele ser rara, pero hay datos de su relativa frecuencia en algunos lugares, sin embargo la mayor parte de las cepas aisladas parecen capaces de producir OTA en cantidades considerables cuando las condiciones ambientales son favorables; mientras el hongo *A. ochraceus* se encuentra bien distribuido en los sistemas productores de café y dado que la producción de OTA es común (alrededor del 80% de las cepas aisladas producen OTA), se constituye como la especie productora de OTA más importante en el café. Además de *A. ochraceus* se han citado diversas especies análogas con capacidad ocratoxigénica tales como: *A. melleus*, *A. sulphureus*, *A. alliaceus*. (FAO 2009, Soriano 2007).

El café a veces contiene OTA a la hora de la cosecha, pero el período más importante para que se produzca en cantidades problemáticas es la poscosecha, debido a que las fuentes principales de contaminación con hongos son el suelo, el equipo y las superficies del patio de secado. Otros factores que permiten el crecimiento de hongos son: la presencia de insectos y granos dañados, el humedecimiento del producto parcialmente seco, la mezcla de productos con diferentes grados de humedad, el almacenamiento por largos períodos de tiempo y en condiciones en las que se produzca condensación. (Taniwaki et al. 2003, FAO/MAG/ANECAFE 2006).

2. JUSTIFICACION

En un mercado altamente competitivo, la materia prima está sometida a estándares de calidad cada vez más estrictos. Las exigencias de calidad son alimentadas tanto por la necesidad de seguridad sanitaria como por una mayor conciencia social y ambiental por parte de los consumidores, principalmente en Estados Unidos, Europa y Japón. En estos mercados nace la presión del sector consumidor para que productos frescos y transformados en distintos productos manufacturados, tengan su origen en sistemas de producción que garanticen la aptitud sanitaria del producto y su competitividad en los mercados.

En este contexto, frente a los nuevos escenarios de negociación que plantea el mundo globalizado es importante adecuar las estrategias de investigación y fortalecimiento del sector agropecuario y rural, hacia un modelo de desarrollo equitativo, participativo y sostenible, que conlleve a garantizar la competitividad, la soberanía y la seguridad Alimentaria del Ecuador, bajo la nueva visión de la Inocuidad Alimentaria de no solo satisfacer las demandas de los mercados, sino también que sus objetivos apunten a fortalecer el nivel de vida de la población a través de la equidad de acceso a alimentos inocuos tanto en el mercado interno como en el internacional.

Al aislar e identificar las cepas de hongos presentes y conocer su acción ocratoxigénica, en muestras de café verde proveniente de las principales zonas de producción del país, se puede tomar medidas preventivas y controlar la producción de hongos toxigénicos y por tanto de la OTA, permitiendo la producción de café inocuo y de alta calidad. Por otra parte, se contribuye a la mejora de la calidad y el valor de todos los tipos de café del Ecuador, así como de las condiciones de vida de la población vinculada a este cultivo.

Por otra parte, la determinación en el laboratorio del porcentaje de humedad y la actividad de agua de las muestras permitirán definir si el proceso de secado de los granos de café se realiza de una manera adecuada evitando la contaminación, el desarrollo y la proliferación de las diferentes especies de hongos, en las principales zonas cafetaleras del país.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la capacidad ocratoxigénica de las principales cepas de hongos productores de Ocratoxina A, en el café verde procedente de las zonas de mayor producción a nivel nacional.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Aislar e identificar las especies: *ochraceus*, *carbonarius* y *niger* del género *Aspergillus*, causantes de la producción de Ocratoxina A, en el café verde de producción nacional
- Cuantificar la capacidad ocratoxigénica de las cepas identificadas, sometidas a condiciones óptimas de actividad de agua (a_w), pH, temperatura y nutrientes, mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

4. HIPOTESIS

Hipótesis nula (H₀): En las muestras de café verde de las principales zonas de producción nacional, no se aislaron e identificaron los hongos productores de Ocratoxina A.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

- Muestras de café verde seco de las especies arábigo y robusta, proveniente de cuatro zonas de producción del país
- Equipos y materiales de laboratorio (Anexo 1)

5.2. METODOLOGÍA.

5.2.1. Características del Sitio Experimental.¹

- Departamentos de Nutrición y Calidad y Protección Vegetal, INIAP, Estación Santa Catalina

Ubicación

Provincia: Pichincha
Cantón: Mejía
Parroquia: Cutuglahua
Lugar: Estación Experimental Santa Catalina

Situación Geográfica

Altitud: 3058m
Latitud: 00°22'S
Longitud: 78°22'O
Temperatura promedio: 11.6 °C
Clima: Templado Húmedo

5.2.2. Factores en estudio:

En el Cuadro 1, se identifica las provincias y cantones de mayor producción de café verde a nivel del país, tanto para la especie robusta como para la especie arábigo, definiendo como factores en estudio las especies de café y las zonas de producción.

Cuadro 1. Zonas de mayor producción a nivel nacional de Café Robusta y Arábigo

| Especie | Provincia | Cantones |
|--------------|------------------------|--------------------------------------|
| Café Robusta | Francisco de Orellana, | Orellana, Loreto, Joya de los Sachas |
| Café Arábigo | Manabí | Jípijapa, Paján, 24 de Mayo |
| | El Oro | Balsas, Las Lajas, Marcabelí |
| | Loja | Chaguarpamba, Puyango, Quilanga |

Fuente: Consejo Cafetalero Nacional (COFENAC), 2008

¹ Fuente:

Documento de difusión del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Santa Catalina: "Tecnología para la Seguridad, la Soberanía Alimentaria y el Desarrollo Agrícola de la Región Interandina". 1961-2008 p.3.

5.2.3. Unidad experimental.

Constituida por 500g de café verde seco.

5.2.4 Tratamientos

La definición de tratamientos se realiza de manera individual tanto para café Arábigo como para café Robusta, de acuerdo a las zonas de producción identificadas para cada variedad. En cada cantón se seleccionarán tres localidades (Fincas) F_1 , F_2 , F_3 donde se tomarán las muestras respectivas.

Cuadro 2. Tratamientos / Café Robusta/ Provincia de Orellana

| Provincia | N° | Tratamiento |
|---|----------|--|
| P₁ (Orellana) | 1 | P ₁ C ₁ F ₁ |
| | 2 | P ₁ C ₁ F ₂ |
| | 3 | P ₁ C ₁ F ₃ |
| | 4 | P ₁ C ₂ F ₁ |
| | 5 | P ₁ C ₂ F ₂ |
| | 6 | P ₁ C ₂ F ₃ |
| | 7 | P ₁ C ₃ F ₁ |
| | 8 | P ₁ C ₃ F ₂ |
| | 9 | P ₁ C ₃ F ₃ |

Cuadro 3. Tratamientos / Café Arábigo/ Provincias Manabí, El Oro, Loja

| Manabí (P₂) | | El Oro (P₃) | | Loja (P₄) | |
|-------------------------------|--|-------------------------------|--|-----------------------------|--|
| N° | Tratamiento | N° | Tratamiento | N° | Tratamiento |
| 1 | P ₂ C ₁ F ₁ | 1 | P ₃ C ₁ F ₁ | 1 | P ₄ C ₁ F ₁ |
| 2 | P ₂ C ₁ F ₂ | 2 | P ₃ C ₁ F ₂ | 2 | P ₄ C ₁ F ₂ |
| 3 | P ₂ C ₁ F ₃ | 3 | P ₃ C ₁ F ₃ | 3 | P ₄ C ₁ F ₃ |
| 4 | P ₂ C ₂ F ₁ | 4 | P ₃ C ₂ F ₁ | 4 | P ₄ C ₂ F ₁ |
| 5 | P ₂ C ₂ F ₂ | 5 | P ₃ C ₂ F ₂ | 5 | P ₄ C ₂ F ₂ |
| 6 | P ₂ C ₂ F ₃ | 6 | P ₃ C ₂ F ₃ | 6 | P ₄ C ₂ F ₃ |
| 7 | P ₂ C ₃ F ₁ | 7 | P ₃ C ₃ F ₁ | 7 | P ₄ C ₃ F ₁ |
| 8 | P ₂ C ₃ F ₂ | 8 | P ₃ C ₃ F ₂ | 8 | P ₄ C ₃ F ₂ |
| 9 | P ₂ C ₃ F ₃ | 9 | P ₃ C ₃ F ₃ | 9 | P ₄ C ₃ F ₃ |

5.2.5. Tipo de diseño:

Se utilizará un diseño completamente al azar DCA con 9 tratamientos y 2 repeticiones por tratamiento para cada provincia y especie de café, según se describe en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Esquema del análisis de varianza por provincia para café Arábigo y café Robusta

| Fuente de variación | Grados de Libertad |
|---------------------|--------------------|
| TOTAL | 17 |
| Tratamientos | 8 |
| Error experimental | 9 |

Adicionalmente se aplicará un diseño completamente al azar DCA, combinado entre provincias con 27 tratamientos y dos repeticiones por tratamiento, para el caso del café Arábigo, Cuadro 5.

Cuadro 5. Esquema del análisis de varianza combinado entre provincias productoras de café Arábigo

| Fuente de variación | Grados de Libertad |
|------------------------------------|--------------------|
| TOTAL | 53 |
| Localidades (L) | 2 |
| Tratamientos (t) | 8 |
| Localidades (L) x Tratamientos (t) | 16 |
| Error Experimental | 27 |

5.2.7. Análisis funcional: Para los factores e interacciones significativas se aplicará la Prueba de Tukey al 5%

5.2.8. Coeficiente de variación: Se determinará el CV expresado en porcentaje %

5.2.9. Variables y métodos de evaluación

Se determinarán las siguientes variables:

Actividad de agua (a_w).- Los microorganismos necesitan la presencia de agua en una forma disponible para crecer y llevar a cabo sus funciones metabólicas. La mejor manera de medir la disponibilidad es mediante la actividad de agua (a_w) que se la define como la relación entre la presión de vapor del agua del alimento (p) y la del agua pura (p_0) a la misma temperatura. Para la determinación de la a_w , se utilizará el equipo p_{a_w} kit water activity meter disponible en el Departamento de Nutrición y Calidad. (Court 2001, Samson y Hoekstra 1995)

Porcentaje de Humedad (%).- El análisis de humedad se determina por gravimetría de acuerdo al método de análisis MO-LSAIA-01 vigente en el Laboratorio LSAIA del Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP.

Contenido de Ocratoxina A (ppb). La producción de OTA se cuantificará por Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC, cuyo protocolo está basado en el Método Oficial 2004. 10 de la A.O.A.C 2005, adaptado y validado en el Laboratorio LSAIA del Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP.

6. MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO.

6.1. Toma de Muestras:

Con el apoyo del Consejo Cafetalero Nacional COFENAC, se seleccionarán las principales zonas de producción a nivel nacional, divididas en provincias y cantones. Dentro de cada cantón se seleccionarán 3 fincas más representativas donde se realizará la toma de muestras, de acuerdo a lo establecido en la Regulación (EC) No. 401/2006, de la Unión Europea, Cuadro 6.

Cuadro 6. Esquema de la toma de muestras para el análisis de micotoxinas en café según la Regulación EC N° 401/2006

| Alimento | Tamaño del lote (Ton) | Sub-lote. Peso mínimo (Ton) | Numero muestras Incrementales | Peso de muestra colectiva (kg) |
|--|-----------------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Café (Almendras, molido e instantáneo) | ≥ 15 | 15-30 | 100 | 10 |
| | ≤ 15 | -- | 10-100 | ≤ 10 |

Para obtener la muestra final para el laboratorio, se parte de la muestra colectiva constituida por la suma de las muestras incrementales, es decir del número de submuestras que se debe tomar en función del tamaño del lote para que la muestra sea representativa, se homogeniza bien esta muestra y mediante cuarteo se llega a una muestra final de 2 Kg. De esta muestra se depositarán 500 g en fundas estériles, para ser trasladadas al Departamento de Protección Vegetal de la EESC, para el aislamiento e identificación de los hongos y para la determinación de la Actividad de agua y del Porcentaje de Humedad en el Departamento de Nutrición y Calidad.

Las muestras, se colectarán después del secado en finca o secado después del beneficio húmedo, considerado como el primer punto crítico de control para evitar la presencia de hongos y formación de OTA, acorde al Plan Nacional de Acción para la prevención de Ocratoxina A (OTA) en el café ecuatoriano, 2006.

La latitud y longitud geográfica de cada finca será fijada mediante un GPS (sistema de posicionamiento satelital) para facilitar su referencia y ubicación posterior. La caracterización de la huerta en términos de número de árboles, grado de asociación con otros cultivos, entre otras características, será información relevante a levantarse una vez que se haya completado la definición de las fincas que formaran parte del estudio. Los registros climáticos incluirán datos de precipitación, temperatura media, temperatura máxima, temperatura mínima, humedad relativa.

Adicionalmente y como información secundaria, se observará los protocolos de manejo poscosecha en cada una de las finca seleccionadas.

6.2. Determinación de la actividad de agua (a_w) en las muestras de café.

Pesar 100g de la muestra, moler y mezclar, luego pesar aproximadamente 1g de la muestra ya mezclada y colocarla en el recipiente del equipo a_w kit water activity meter previamente calibrado, cerrar, presionar el botón izquierdo del equipo y esperar que finalice la lectura automáticamente. Realizar la medición por duplicado y anotar los valores de a_w y temperatura de la muestra.

6.3. Determinación del porcentaje de humedad en las muestras de café.

Colocar las cápsulas de aluminio en una estufa a 105 °C por 8 horas enfriarlas en un desecador y pesarlas. Luego se pesa 2g de la muestra previamente molida, se extiende en toda la superficie de la cápsula y se lleva a la estufa a 105°C por 12 horas, se enfría y se pesa hasta masa constante. Determinar el % de humedad por diferencia de peso y realizar el análisis por duplicado.

Para la ejecución de los trabajos de laboratorio 6.3, 6.4 y 6.5, se cuenta con la colaboración y apoyo del Departamento de Protección Vegetal de la EESC, en cuyos laboratorios se ejecutarán las mismas.

6.4. Aislamiento de los hongos productores de Ocratoxina A en las muestras de café.

El Método de aislamiento se basa en el Manual de Análisis Bacteriológico (BAM) de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA). (Anexo 4).

Se procederá a llevar las muestras a - 20 °C por 72 horas para matar insectos que podrían interferir con el análisis, luego transferir aproximadamente 50gramos de la muestra en un vaso de precipitación estéril y con la ayuda de una pinza mediante siembra directa colocar 5 granos de café sobre la superficie solidificada del medio de cultivo Agar Glicerol-Diclorán (DG18) en el plato de Petri. Sembrar un total de 50 granos por cada muestra. Incubar las cajas a 25 °C por 5 días. Luego con la ayuda de una pinza tomar parte del micelio de cada hongo aislado y sembrar sobre medio de cultivo Agar Potato Dextrosa (PDA) para obtener colonias puras.

6.5. Identificación de los hongos productores de Ocratoxina A en las muestras de café.

La identificación se realizará a través de claves dicotómicas mediante la observación de las característica macro y micro-morfológicas de las colonias por medio de la Guía de Laboratorio para especies de *Aspergillus* y sus teleomorfos (PITT J., & KLICH M. 1994).

Por cada colonia pura aislada, se usa cuatro platos de Petri; dos con Agar Czapek-Levadura (CYA), uno con Agar Malta-Glucosa (MEA) y el ultimo con Agar Czapek-Sacarosa 20 (CY20S). Cada plato es inoculado en tres puntos equidistantes. Un plato de CYA es incubado a 37°C y todas los demás son incubados a 25°C durante 7 días. Luego se registran las características macro y micro-morfológicas para acceder a las claves de identificación. (Anexo 6).

6.6. Evaluación de la capacidad ocratoxigénica de los hongos identificados.

6.6.1. Producción de OTA

Para obtener la máxima producción de OTA a partir de los hongos identificados, se va a utilizar 2 medios de cultivo: Agar extracto de Levadura-Sacarosa (YES) para las especies *A. ochraceus* y *A. niger* y Agar Czapek-Levadura (CYA) para *A. carbonarius*; utilizando los factores óptimos de actividad de agua, temperatura y pH señalados en el Cuadro 8. La incubación de las especies identificadas se realizará entre 5 y 10 días. (Franco 2005).

Cuadro 7. Parámetros óptimos para la producción de Ocratoxina A

| Especie | Actividad de agua (a_w) | Temperatura (°C) | pH |
|-----------------------|--|-------------------------|-----------|
| <i>A. ochraceus</i> | 0,95-0,99 | 30-37 | 5,5-6 |
| <i>A. niger</i> | 0,96-0,99 | 20-25 | 5-10 |
| <i>A. carbonarius</i> | 0,98-0,99 | 15-20 | 5-7 |

6.6.2 Determinación y cuantificación de Ocratoxina A mediante HPLC.

Luego de los 10 días de incubación moler en un mortero todo el contenido (micelio y agar) del plato de Petri, llevar a un frasco de vidrio y adicionar 200ml de la solución de metanol, homogenizar, filtrar la muestra, tomar 4ml del filtrado y aforar a 100ml con solución buffer de fosfato salino (PBS). Posteriormente pasar los 100ml a través de una columna de inmunoafinidad, luego pasar 4 ml. de metanol para eluir la OTA. Evaporar el eluido a sequedad a una temperatura de 55°C. Disolver los residuos secos obtenidos con 300 µL de metanol y agitar por 5 min. Por último inyectar 20 µL en el HPLC. Las condiciones cromatográficas y otras específicas del método se describen en el (Anexo 8).

7. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.

| Fecha | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| Actividad | | | | | | | | | | | | |
| Recolección de información y elaboración del proyecto | | | | | | | | | | | | |
| Aprobación en el INIAP y UCE | | | | | | | | | | | | |
| Adiestramiento y ensayos preliminares | | | | | | | | | | | | |
| Recolección de las muestras para el análisis. | | | | | | | | | | | | |
| Realización de los ensayos experimentales | | | | | | | | | | | | |
| Procesamiento de datos | | | | | | | | | | | | |
| Análisis de resultados | | | | | | | | | | | | |
| Elaboración del documento final | | | | | | | | | | | | |
| Entrega del documento final de tesis | | | | | | | | | | | | |

8. PRESUPUESTO

| CONCEPTO | Unidad | Cantidad | Costo Unitario (\$) | Costo Total (\$) |
|---|--------|----------|---------------------|------------------|
| MANO DE OBRA | | | | |
| Tesista | mes | 12 | 323,85 | 3886,2 |
| INSUMOS Y MATERIALES | | | | |
| Reactivos | | | | |
| Fosfato acido de potasio | g | 500 | 0,08 | 40,00 |
| Sacarosa | g | 1000 | 0,08 | 80,00 |
| Cloro líquido 10% | L | 10 | 1,50 | 15,00 |
| Cloranfenicol | unidad | 100 | 0,16 | 16,00 |
| Acetonitrilo grado HPLC | L | 4 | 20,00 | 80,00 |
| Metanol p.a | L | 20 | 4,95 | 99,00 |
| Metanol grado HPLC | L | 10 | 11,20 | 112,00 |
| Alcohol potable 96% | Kg | 10 | 2,15 | 21,50 |
| Alcohol antiséptico | L | 5 | 2,50 | 12,50 |
| Extracto de levadura | g | 500 | 0,09 | 45,00 |
| Extracto de malta | g | 500 | 0,08 | 38,00 |
| Peptona | g | 500 | 0,09 | 47,00 |
| Agar Dichloran 18% glicerol (DG18) | g | 500 | 0,13 | 66,00 |
| Agar-agar | g | 500 | 0,17 | 84,00 |
| Agar Potato Dextrosa (PDA) | g | 500 | 0,14 | 69,00 |
| Agar Czapek Dox | g | 500 | 0,29 | 145,00 |
| Materiales | | | | |
| Columnas de inmunoafinidad para purificación de OTA OCHRAPREP | unidad | 100 | 13,38 | 1337,78 |
| Platos de Petri | unidad | 1500 | 0,14 | 210,00 |
| Vasos plásticos 100ml | unidad | 60 | 0,25 | 15,00 |
| Porta-objetos | unidad | 50 | 0,04 | 2,12 |
| Cubre-objetos | unidad | 100 | 0,03 | 2,52 |
| Botella autoclavable Marca Boeco 1000ml | unidad | 8 | 19,50 | 156,00 |
| Guantes desechables | unidad | 100 | 0,07 | 6,55 |
| Filtros de protección contra esporas | unidad | 20 | 4,18 | 83,60 |
| Mascarilla 3M | unidad | 2 | 12,48 | 24,96 |
| Bajalenguas | unidad | 500 | 0,01 | 2,80 |
| Papel toalla | rollo | 5 | 6,48 | 32,40 |
| Papel aluminio | unidad | 5 | 4,30 | 21,50 |
| Papel empaque | unidad | 20 | 0,35 | 7,00 |
| Papel parafilm | unidad | 1 | 41,00 | 41,00 |
| Algodón | Kg | 10 | 3,95 | 39,50 |
| Jabón líquido | unidad | 6 | 3,00 | 18,00 |
| Caja térmica 37 litros | unidad | 1 | 50,00 | 50,00 |
| Fundas plásticas estériles 250ml | unidad | 150 | 0,10 | 15,00 |

| Materiales de oficina | | | | |
|----------------------------------|--------------|---------------------------|--------|---------|
| Cartucho para impresora | unidad | 1 | 41,48 | 41,48 |
| Papel bond | resma | 3 | 4,75 | 14,25 |
| Cinta scotch | unidad | 1 | 0,77 | 0,77 |
| Marcador punta fina | unidad | 3 | 1,50 | 4,50 |
| Encuadernación | ejemplar | 8 | 10,00 | 80,00 |
| Aplicaciones Informáticas | | | | |
| Horas de internet | hora | 200 | 0,70 | 140,00 |
| Impresiones | unidad | 1200 | 0,03 | 36,00 |
| Movilización | | | | |
| Pasajes aéreos | unidad | 4 | 120,00 | 480,00 |
| Viáticos y subsistencias | Viático | 10 | 115,00 | 1150,00 |
| | Subsistencia | 10 | 50,00 | 500,00 |
| | | Subtotal | | 9368,93 |
| | | Imprevistos 5% | | 468,45 |
| | | TOTAL | | 9837,38 |

9. BIBLIOGRAFIA.

1. Bravo, B. 2006. Microbiología de los Alimentos: Ecología microbiana (correo electrónico). Quito, EC, Universidad Central del Ecuador.
2. COFENAC (Consejo Cafetalero Nacional, EC). 2008. Zonas de mayor producción a nivel nacional de Café Robusta y Arábigo (correo electrónico). Manta, EC.
3. Commission Regulation (EC) No. 401/2006 de la Unión Europea. 2006. Official Journal of the European Union. Laying down the methods of sampling and analysis for the Official Control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. 70:25.
4. Court, N. 2001. Manual Operator's p_{aw} kit: Water Activity Meter. Washington, US, Pullman. 50p.
5. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT)/MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería, EC)/ANECAFE (Asociación Nacional de Exportadores de Café, EC). 2006. Plan Nacional de Acción para la prevención de Ocratoxina A (OTA) en el café ecuatoriano. Quito, EC. 28p
6. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2007. Prevención de Hongos Productores de Ocratoxina A (OTA) en el café ecuatoriano. Informe Final Proyecto TCP/ECU/3001 (T). Ecuador. 13p
7. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT)/OMS (Organización Mundial de la Salud). 2007. Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. Comité del Codex sobre contaminantes de los alimentos: Documento de debate sobre la Ocratoxina A en el café (en línea). Beijing, CH. Consultado 5 ene. 2009. Disponible en <http://www.codexalimentarius.net>
8. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2009. Reducción de la Ocratoxina A en el café. El problema. Elementos que producen OTA en el café: Organismos que participan en la producción OTA en el café (en línea). Consultado 20 ene. 2009. Disponible en <http://www.coffee-ota.org/faq.asp?lang=es>.

9. Franco, A. 2005 *Aspergillus* sección *Nigri*: Estudio fisiológico y molecular de especies ocratoxigénicas. Tesis Dr. Barcelona, ES, Universidad Autónoma de Barcelona. pp. 28-24 (en línea). Consultado 18 feb. 2009. Disponible en http://www.tdx.cesca.es/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-0809106-114910/aef1de1.pdf
10. IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, CR)/CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CR). 1999. Redacción de Referencias Bibliográficas. 4ed. San José, CR, 40p.
11. INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, EC). 2008. Estación Experimental Santa Catalina. Tecnología para la Seguridad, la Soberanía Alimentaria y el Desarrollo Agrícola de la Región Interandina. Quito, EC p.3
12. Jackson, J; Merker, I; Bandler, R. 2003. FDA Bacteriological Analytical Manual (BAM). Estados Unidos, Chapter 18.
13. MAGAP (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca, EC). 2007. Superficie, Producción y Rendimiento de café. Evolución mensual de las exportaciones de café en grano. Precios del café pagados al productor (correo electrónico). Quito, EC.
14. AOAC (Association of Official Analytical Chemist). 2005. Official Methods of Analysis. 18ed. Arlington, US, Chapter 49, p. 61.
15. Pitt, J; Klich, M. 1994. Laboratory guide to the common aspergillus species y their teleomrphs. Australia, Commonwealth Scientific and Research Organisation. 116p.
16. Samson, R; Hoekstra, E. 1995. Introduction to Food-Borne Fungi. 4ed. Netherlands, Centraalbureau Voor Schimmelcultures. p. 246-247.
17. Soriano, J. 2007. Micotoxinas en Alimentos. Madrid, ES, Santos. p. 35-41.
18. Taniwaki, M; Pitt, J; Texeira, A; Iamanaka, B. 2003 The source of ocratoxin A in Brazilian coffe and its formation in relation to processing methods. International Journal of Food Microbiology. 82: 173-179.

ANEXO 1.

MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS

Materiales:

| | |
|------------------------------|------------------|
| Vasos de Precipitación 300ml | Mandil |
| Porta y cubre objetos | Papel absorbente |
| Asas | Papel aluminio |
| Pinza anatómica punta curva | Papel empaque |
| Platos de Petri | Jabón líquido |
| Guantes | Baja-lenguas |
| Cofia | Algodón |
| Mascarilla | |

Equipos de Laboratorio:

| | |
|--|--|
| Autoclave 121°C 15 min. | Cocineta |
| Cabina de flujo laminar | Balanza analítica sensibilidad 0,1g |
| Mecheros de alcohol | Congelador, -20 °C |
| Higrómetro | Baño de agua, 45± 1°C |
| Termómetro | Incubadora, 25°C, 37°C |
| Equipo p_{a_w} kit wáter activity meter. | pHmetro |
| Equipo HPLC Agilent 1100series | Molino Miller tamaño de partícula 2mm. |
| Microscopio compuesto resolución 40X | Estufa 105 °C |

Reactivos:

| | |
|--|---|
| Nitrato de sodio p.a. | Agar Dhicloran con 18% de glicerol (DG18) |
| Cloruro de potasio p.a. | Extracto de levadura |
| Sulfato de magnesio hepta-hidratado p.a. | Extracto de malta |
| Sulfato ferroso hepta-hidratado p.a. | Peptona |
| Sulfato de Zinc hepta-hidratado p.a. | Agua destilada |
| Sulfato de cobre penta-hidratado p.a. | Solución cloro 0,4 % |
| Fosfato acido de potasio p.a. | Glicerol p. a. |
| Sacarosa p.a. | Alcohol potable |
| Glucosa p. a. | |
| Agar bacteriológico | |

ANEXO 2.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE AGUA

Procedimiento experimental para determinar la actividad de agua mediante el equipo p_{a_w} kit wáter activity meter.

Procedimiento:

- Calibrar el equipo con dos soluciones estándar de actividad de agua conocida: NaCl ($0.76 \pm 0.003a_w$) y ClLi ($0.25 \pm 0.003 a_w$).
- Encender el equipo pulsando el botón derecho.
- Colocar aproximadamente 1g de muestra en el recipiente original del equipo.

- Colocar el recipiente dentro del equipo y pulsar el botón izquierdo, esperar hasta que el equipo indique la lectura mediante una señal.
- Esperar aproximadamente 5 min. hasta que el equipo finalice la lectura automáticamente y anotar el valor de a_w .

ANEXO 3.

DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD.

Método MO-LSAIA-01 vigente en el Laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos LSAIA del Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP

Principio:

Se basa en la determinación de la cantidad de agua presente en la muestra, la cual se obtiene por diferencia de peso

Equipos y Materiales:

1. Balanza analítica
2. Pinza metálica
3. Estufa 105 °C
4. Latas de aluminio
5. Espátula
6. Desecador

Procedimiento:

- Preparación de las latas de aluminio: lavar las latas de aluminio con agua destilada y secar en la estufa a 105 °C por 8 horas, sacar en un desecador, enfriar y pesar.
- Las muestras que han sido molidas pasan a la determinación de humedad, se pesa entre 1 y 2 g de muestra en las latas de aluminio, se lleva a la estufa a 105 °C por 12 horas (preferiblemente toda la noche), se saca en un desecador hasta que estén frías y se pesa.

Cálculos:

Se utiliza la siguiente ecuación:

$$\%H = \frac{Pr mh - Pr ms}{Pr mh - Pr} \times 100$$

Donde:

%H = Porcentaje de humedad

Pr = Peso del recipiente

Prmh = Peso del recipiente más muestra húmeda

Prms = Peso del recipiente mas muestra seca

ANEXO 4.

AISLAMIENTO DE HONGOS

Método utilizado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), Bacteriological Analytical Manual (BAM). Capítulo 18.

Principio:

Este método permite el aislamiento de especies individuales de hongos, incluyendo a los hongos productores de micotoxinas, mediante la técnica de siembra directa en alimentos que pueden ser manejados con pinzas como: granos secos, nueces, especias enteras, granos de café y cacao, etc.

Equipo y materiales:

7. Congelador, -20 °C
8. Vasos de precipitación, estériles , 300ml
9. Pinzas estériles
10. Autoclave
11. Baño de agua, 45± 1°C
12. Incubadora, 25°C
13. pHmetro
14. Termómetro

Medios y reactivos:

1. Agar Dichloran con glicerol al 18%
2. Agar malta (MA)
3. Solución de antibióticos
4. NaOCl (decolorante comercial) solución, 10%
5. Agua destilada estéril

Solución de Antibióticos:

Los antibióticos son adicionados al medio micológico para inhibir el crecimiento bacteriano. Chloranfenicol es el antibiótico de elección, porque es estable bajo las condiciones del autoclave. Por lo tanto la preparación de los medios es fácil y rápida debido a la eliminación del paso de filtración. La concentración recomendada de este antibióticos 100mg/litro en el medio. Si el crecimiento bacteriano es evidente, prepare medio adicionando 50mg/litro de chloranfenicol antes del autoclavado y 50mg/litro de chlorotetraciclina filtrada y esterilizada cuando el medio este a temperatura adecuada, antes de verter en las cajas.

Prepare la solución stock disolviendo 0,1g de chloranfenicol en 40ml de agua destilada; adicionar esta solución a 960ml del medio preparado antes de autoclavado. Cuando se usa los dos chloranfenicol y chlorotetraciclina, adicionar 20ml de la solución stock de chloranfenicol sobre 970ml del medio antes del autoclavado. Luego preparar la solución stock de chlorotetraciclina disolviendo 0,5g del antibiótico en 100ml de agua destilada, filtrar y esterilizar. Usar 10ml de esta solución por cada 990ml de medio autoclavado y temperado. Refrigerar en la oscuridad y rehusar la solución stock restante hasta por un mes. Solución stock debería ser llevada a temperatura ambiente antes de añadirse al medio temperado.

Análisis de los alimentos con la superficie no desinfectada (NSD):

Muestras y preparación de los medios

Antes de la siembra, llevar las muestras a – 20 °C por 72 horas para matar insectos que podrían interferir con el análisis.

Preparar DRBC como se describe en el apéndice. Si DRBC no está disponible, o la actividad de agua de la muestra analizada es menor que 0.95, use agar DG18. Los medios deberían ser preparados no más de 24 h previo a su uso.

Siembra e incubación de la muestra.

De cada muestra, transferir cerca de 50g en un vaso de precipitación estéril de 300ml. Usando pinzas flameadas con etanol al 95% colocar ítems intactos del alimento sobre la superficie solidificada del agar, 5-10 ítems por plato (dependiendo del tamaño del ítem de alimento) 50 ítems en total por muestra

Flamear las pinzas entre la siembra de cada ítem. Alternar el uso de varias pinzas para evitar el exceso de calor. No sembrar ítems manchados o con enmohecimiento visible.

Alinear 3-5 platos de Petri en montones e identificar el número de la muestra, más la fecha de la siembra. Incubar las cajas sin molestar en la oscuridad a 25°C por 5 días. Si no hay crecimiento en 5 días de incubación, reincubar por otras 48 h permitiendo que el calor y los minerales se acentúen en las células y esporas para que tengan tiempo suficiente para crecer.

Lectura de las cajas

Determinar el número de hongos en porcentaje. Si los hongos emergen de todos los 50 ítems de alimento, se tiene el 100%; si emergen de 32 ítems, tenemos un 64% de contaminación. Determinar el porcentaje individual de los hongos por género y especie de esta manera. Análisis experimentados pueden identificar *Aspergillus*, *Penicillium* y muchos otros géneros de hongos producidos en los alimentos directamente sobre el medio con bajo poder de resolución (10-30X). Aislar las colonias individuales sobre PDA o MA.

ANEXO 5.

IDENTIFICACION DE HONGOS MEDIOS Y METODOS

PITT J.. & KLICH M. (1994) Laboratory guide to the common aspergillus species y their teleomrphs

Principio:

El sistema de identificación usado en esta guía está basado en tres medios y dos temperaturas. Los medios y las condiciones de incubación usados son:

1. Agar Czapek extracto de levadura (CYA) con incubación a 25 y 37°C
2. Agar extracto de malta (MEA) incubado a 25°C
3. Agar Czapek extracto de levadura con 20% de sacarosa (CY20S) incubado a 25°C

Procedimiento:

El tiempo de preparación de los medios puede ser reducido considerablemente con el uso Czapek concentrado. Debería ser agitado antes de usar por la precipitación del $\text{Fe}(\text{OH})_2$. Como los ingredientes de los medios han llegado a ser más puros en los años recientes, las dificultades con el alcance y el color de la esporulación sobre CYA han sido encontradas. Para resolver este problema, la formulación de Czapek concentrado ha sido modificada incluyendo trazas de Zn. y Cu.

Estos medios deben ser esterilizados por autoclavado a 121°C por 15min. Agua destilada es recomendada pero no esencial porque ninguno de los medios esta totalmente definido. Los químicos utilizados podrían ser de grado analítico cuando sea posible; Sin embargo, la sacarosa debe estar libre de dióxido de azufre, el extracto de malta comercial, peptona bacteriológica, y el agar grado USP son aceptables. La fuerza para solidificarse del agar varía y puede necesitar ser ajustada.

Para cada colonia, cuatro cajas Petri de 15x100mm son usadas; dos con CYA, y cada una de las otras con los otros medios. Cada caja es inoculada en tres puntos, equidistantes desde los bordes de la caja y uno del otro.

Una caja de CYA es incubada a 37°C y todas las demás son incubadas a 25°C en la oscuridad. Todas las cajas son observadas después de 7 días de incubación. Después de la observación inicial, los aislamientos de los géneros teleomorfos podrían requerir una segunda semana de incubación, o en algunos casos mas, para el completo desarrollo de las ascosporas.

Preparación de los portaobjetos humedecidos:

Dos gotas de un fluido general 74% (agua, 25% alcohol y 1% de dioctil sulfosuccinato de sodio) son colocados sobre el portaobjetos. Una pequeña cantidad de material es removido desde el borde de la porción esporulada de la colonia de CYA con una pinza o asa y es colocada en una de las gotas. Una segunda muestra de material es removida desde cerca del centro de la misma colonia y colocada en la misma gota. Si la muestra se pega a la pinza o al asa esta puede ser tomada con una segunda asa o con el borde de un cubreobjetos y otra gota del fluido. Usando el mismo procedimiento, colocar material desde una colonia de MEA en la segunda gota del portaobjetos. Si las colonias de CYA o MEA no están esporuladas bien, Material de otro medio de crecimiento puede ser usado. Un cubreobjetos de 22 x 22mmes colocado sobre cada gota en el portaobjetos. Usando este método, el medio influye en las diferencias de las características microscópicas que pueden ser observadas. La placa es examinada y los colores destacados. Si durante su examinación es determinada una mancha ayudaría en la observación, colocar una gota en el borde del cubreobjetos permitiéndose en cualquiera de los dos cubreobjetos la difusión a través de la base o sacando la mancha a través de un papel absorbente por el lado opuesto del cubreobjetos. El tinte usado frecuentemente es lacto-fuchsina (0.1% de fuchsina ácida disuelta en 85% de ácido láctico altamente puro).

ANEXO 6.

CLAVES DE IDENTIFICACION DE LAS PRINCIPALES ESPECIES DEL GENERO *Aspergillus* PRODUCTORAS DE MICOTOXINAS.

Las claves fueron obtenidas del libro Micotoxinas en Alimentos SORIANO J. (2007.)



Cabezas conidiales del género Aspergillus: a) uniseriada b) biseriada

1. a. Cabeza conidial predominante biseriada (con métula).....2
1. b. Cabeza conidial uniseriada (sin métula), vesícula claviforme, colonias color gris-verdoso.....sección *Clavati* (*A. clavatus*)
2. a. Colonias marronáceas o amarillas. Cabezas conidiales siempre biseriadas.....3
2. b. Colonias verde-amarillentas, oliváceas o negras.....4
3. a. Colonias marrón rosado o canela, cabeza conidial columnar... ..sección *Terrei* (*A. terreus*)
3. b. Colonias amarillo-ocráceas, cabeza conidial radialsección *Circumdati* (*A. ochraceus*)
4. a. Colonias negras, cabeza conidial radial sección *Nigri* (*A. carbonarius*, *A. niger*)
4. b. Colonias verde-amarillentas u oliváceas, cabeza conidial radial ...sección *Flavi* (*A. flavus*, *A. paraciticus*)

ANEXO 7.

COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), Bacteriological Analytical Manual (BAM). chapter 18.

Agar Glicerol-Diclorán 18% (DG18)

| | |
|---------------------------------------|------|
| Glucosa | 10g |
| Peptona | 5g |
| Fosfato monopotásico | 1g |
| Sulfato de magnesio hepta-hidratado | 0.5g |
| Dicloran (2,6-dicloro-4-nitroanilina) | 1ml |
| solución (0,2%p/v) en etanol | |

| | |
|----------------|------|
| Cloranfenicol | 0.1g |
| Agar | 15g |
| Agua destilada | 1L |
| Glicerol | 220g |

Mezclar los ingredientes hasta disolver el agar, añadir el glicerol y esterilizar a 121 °C durante 15 min. Se usa para muestras con actividad de agua menor que 0,95. Se incuba comúnmente a 25°C durante 7 a 21 días. Se usa para el aislamiento de hongos.

Agar Malta (MA)

| | |
|-------------------|-----|
| Extracto de malta | 20g |
| Agar | 15g |
| Agua destilada | 1L |

Mezclar los ingredientes hasta disolver el agar. Esterilizar a 121 °C durante 15 min. Este medio es recomendado como un medio general de mantenimiento de los hongos.

Laboratory guide to the common aspergillus species y their teleomorphs PITT J., & KLICH M. (1994)

Czapek Concentrado

| | |
|---------------------------------------|-------|
| NaNO ₃ | 30.0g |
| KCl | 5.0g |
| MgSO ₄ . 7H ₂ O | 5.0g |
| FeSO ₄ . 7H ₂ O | 0.1g |
| ZnSO ₄ . 7H ₂ O | 0.1g |
| CuSO ₄ . 7H ₂ O | 0.05g |
| Agua destilada 100ml | 100ml |

Agar Czapek Extracto de levadura (CYA)

| | |
|----------------------|--------|
| Fosfato monopotásico | 1.0g |
| Czapek Concentrado | 10.0ml |
| Extracto de levadura | 5.0g |
| Sacarosa | 30.0g |
| Agar | 15g |
| Agua destilada | 1.0L |

Agar Czapek Extracto de levadura con 20 % de Sacarosa (CY20S)

| | |
|----------------------|--------|
| Fosfato monopotásico | 1.0g |
| Czapek Concentrado | 10.0ml |
| Extracto de levadura | 5.0g |
| Sacarosa | 200.0g |
| Agar | 15g |
| Agua destilada | 1.0L |

Agar Extracto de Malta (MEA)

| | |
|-------------------|-------|
| Extracto de malta | 5.0g |
| Peptona | 1.0g |
| Glucosa | 20.0g |
| Agar | 20.0g |
| Agua destilada | 1.0L |

Estos medios deben ser esterilizados en un autoclave a 121°C por 15min. Agua destilada es recomendada pero no esencial porque ninguno de los medios esta totalmente definido. Las sales minerales utilizadas podrían ser de grado analítico cuando sea posible; Sin embargo, la sacarosa debe estar libre de dióxido de azufre, el extracto de malta comercial, peptona bacteriológica, y el agar grado USP son aceptables. La fuerza para solidificarse del agar varía y puede necesitar ser ajustada.

ANEXO 8.

DETERMINACION Y CUANTIFICACION DE OCRATOXINA A

Método Oficial 2004. 10 de la A.O.A.C 2005. Ocratoxina A en café verde. Adaptado y validado en el Laboratorio LSAIA del Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP.

Principio:

El método se basa en la utilización de columnas de inmunoafinidad que poseen anticuerpos monoclonales específicos para OTA, la toxina es extraída de la muestra con soluciones de metanol con bicarbonato de sodio, la misma solución es aplicada sobre la columna de inmunoafinidad que atrapa a la toxina, la columna es lavada y la OTA es recuperada con una solución de metanol, la toxina recuperada es cuantificada por HPLC, mediante el equipo HPLC Agilent 1100 series.

Procedimiento:

Molienda y pesaje:

- Moler la muestra hasta obtener un tamaño de partícula de 1mm.
- Colocar un frasco de vidrio de 500ml, con número de identificación de la muestra sobre la balanza, encerar la balanza.
- Homogenizar la muestra realizando movimientos envolventes de la muestra dentro de la funda plástica.
- Pesar 25gramos de muestra previamente homogenizada en el frasco de vidrio con la ayuda de una espátula
- Llevar el frasco de vidrio con la muestra hacia el lugar de extracción.

Observaciones:

- Para la operación de pesado de la muestra se debe tomar en consideración dos cifras decimales.
- Si en caso existe dificultad con la molienda de los granos, se recomienda utilizar nitrógeno líquido para congelar la muestra y facilitar el proceso.

Extracción

- Adicionar a la muestra 200ml de solución de metanol: bicarbonato de sodio 3% (1:1, v/v).
- Colocar el frasco en el ultra turrax, asegurar el mismo y homogenizar durante 5 minutos a alta velocidad.
- Filtrar la muestra usando papel filtro.
- Filtrar el extracto a través de membrana de fibra de vidrio.
- Tomar 4ml de filtrado y transferir a un balón volumétrico de 100ml, aforar a 100ml con la solución tampón PBS 1% y homogenizar.
- El extracto restante taparlo y almacenar en refrigeración.

Purificación de la muestra

- Adaptar una jeringa de polipropileno de 60ml a una columna de inmunoafinidad y conectar al sistema de filtración al vacío.
- Pasar cuantitativamente el contenido del balón de 100ml por la columna, dejar pasar a través de la columna con un flujo de 2/3 ml por minuto aproximadamente.
- Lavar la columna con 10ml de agua y dejar secar la columna.
- Desconectar la columna del sistema de vacío y aplicar presión positiva.

- Sustituir la jeringa de plástico de 60ml por una jeringa de plástico de 10ml.
- Transferir 4ml de metanol grado HPLC por la jeringa de vidrio, dejar en contacto por 3 minutos y eluir la ocratoxina A utilizando presión positiva y controlando el flujo por medio del embolo de la jeringa (2-3ml/min).
- Evaporar el eluido a sequedad utilizando nitrógeno en baño de agua con agitación y control de temperatura a 55°C.

Cuantificación por cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

- Redisolver los residuos obtenidos en la etapa de purificación con 300 µL de metanol grado HPLC, agitar utilizando un agitador de tubos (vortex) y en un baño ultrasonido por 5 minutos.
- Inyectar 20 µL en el HPLC (Agilent 1100) bajo las siguientes condiciones:

Columna: Zorbax SB-C18 (150 x 4.6 mm), tamaño de partícula de 5 µm.

Temperatura de la columna: 30 °C.

Detector de Fluorescencias: longitud de onda de excitación 330 nm, emisión 475nm.

Fase móvil: acetonitrilo; metanol; ácido acético 0.2% en agua (40:30:30 v/v/v).

Flujo 1ml/minuto

Volumen de inyección: 20 µL.

Tiempo de cromatografía 7 minutos

Tiempo de retención de la toxina: 4.125 minutos.

Cálculos y expresión de resultados.

La cuantificación se realiza utilizando una curva de calibración realizada previamente en el equipo y utilizando la siguiente fórmula:

$$OTA (\mu\text{g}/\text{K.g}) = \frac{(ABC)}{(DE)}$$

A = área del pico correspondiente a OTA de la muestra

B = concentración de OTA (ng/µl) de solución estándar

C = Volumen final de la muestra (µl)

D = área del pico de OTA en la solución patrón.

E = peso de la muestra representada en la solución (g).